

# SZÓJÁN ELŐFORDULÓ *PHOMA*-SZERŰ GOMBÁK FILOGENETIKAI VIZSGÁLATA BAYESIAN MÓDSZERREL

Irinyi László – Kövics György – Sándor Erzsébet

Debreceni Egyetem, Agrár-és Műszaki Tudományok Centruma, Növényvédelmi Tanszék,  
Debrecen

## Irodalmi áttekintés

A Coelomycetes osztályba tartozó *Phoma* genus világszerte elterjedt, többségében fitopatogén, opportunista parazita vagy szaprofiton életmódot folytató fajokat foglal magába. Napjainkig mintegy 2000 *Phoma* fajt azonosítottak világszerte (Boerema és mtsai, 2004).

Napjainkig a *Phoma* fajok rendszerezése a többi gombacsoportéhoz hasonlóan nagyrészt morfológiai, fenotípusos és fiziológiai vizsgálatokon alapult. Ennek a munkának az összefoglalásaként a közelmúltban jelent meg egy monográfia *Phoma* Identification Manual címmel (Boerema és mtsai, 2004), amelyben a szerzők összegzik a *Phoma* fajok morfológiai szempontok alapján, több mint 40 év kutatási eredményei nyomán tisztázott rendszerét.

Boerema és munkatársai (Boerema és mtsai, 1965, 1968, 1971, 1973, 1977, 1981) mellőzte az addig használt gazdanövény vagy szubsztrátum specificitást, mint a *Phoma* fajok elsődleges rendszertani kritériumát és megpróbálták, mind *in vivo* és *in vitro* körülmények között stabil rendszertani bélyegek alapján rendszerezni a *Phoma* fajokat, amelyeket standardizált körülmények között vizsgált telepjellemzőkkel egészítettek ki. Fontosnak találták a piknídium falának szerkezetét, valamint azt, hogy a piknídium rendelkezik-e sertével (setae). A genus fajainál a piknídium morfológiája bizonyult a legfontosabb hasznosítható bélyegnek az egyes szekciók elkülönítésénél. A piknídiumok rendszerint csupaszok, de esetenként a serték (setae) jelenléte és a piknídiumfal morfológiája szintén taxonómiai jelleggel bír. Ugyancsak taxonómiai jelentőséget tulajdonítanak a dictyoclamidospóra meglétének is. Tekintettel arra, hogy a piknídiumok és a konídiumok nagysága és alakja változó a tenyésztési jellemzők nélkülözhetetlennel bizonyultak a fajok vagy fajokon belüli taxonok elkülönítésében. Néhány másodlagos anyagcseretermék szintén specifikus tulajdonság lehet egy fajra nézve. Jellegzetes mintázatú kristályképződés vagy kémiai reakcióval (NaOH teszt) kimutatható pigmentképzés („E” metabolit) segítik a gyors azonosítást (van der Aa és mtsai, 1990; Noordeloos és mtsai, 1993).

A '90-es évek közepén a molekuláris biológia és a biokémia fejlődésének köszönhetően izoenzimeket (fehérje polimorfizmus) próbáltak meg molekuláris markerként használni a *Phoma* genusban, hogy elkülönítsék a morfológiailag azonos megjelenésű, de feltételezhetően eltérő fajhoz tartozó izolátumokat (Monte és mtsai, 1990, 1991; Kövics és de Gruyter, 1995; Saniewska és Prus-Glowacki, 1998; Kövics, 2004).

Más gombacsoportoknál már használt, és többé-kevésbé megbízhatónak bizonyult molekuláris markerek szekvencia analízise a *Phoma* fajoknál mindezidáig alig került alkalmazásra.

Napjainkban a filogenetikai törzsfa készítésben az egyik leggyakrabban használt molekuláris biológiai módszer kiválasztott DNS szakaszok nukleinsav sorrendjének meghatározása, és ezeknek az összehasonlító elemzése.

A filogenetikai célú szekvencia összehasonlítás nagyrészt olyan genom szakaszok vizsgálatán alapul, amelyek minden élőlényben előfordulnak, és meglehetősen konzervatívak maradnak az evolúció során, mint pl. a riboszómális géneket kódoló szekvenciák. Ezek közül nagyon sok tudományos munka alapszik az úgynevezett ITS (Internal Transcribed Spacer) régió vizsgálatán, annak köszönhetően, hogy ennek a régióknak a nukleinsav sorrendje nagy variabilitást mutat más régiókhoz képest, így alkalmas mind a fajokon belüli, mind a fajok

közötti filogenetikai kapcsolatok felderítésére. Lutzoni és mtsai (2004) szerint a gombák körében végzett filogenetikai vizsgálatok 83,9%-a a riboszómális géneket kódoló tandem szekvenciák vizsgálatán alapult. A molekuláris biológiában újabb és újabb géneket (markereket) írnak le, amelyek tulajdonságaikból adódóan alkalmasak lehetnek filogenetikai kapcsolatok elemzésére.

Az alábbiakban a szóján (*Glycine max*) előforduló *Phoma*-szerű fajok molekuláris taxonómiáját kívánjuk tárgyalni nukleinsav szekvenciák alapján, mivel a szóján előforduló, szimptomatológiai és morfológiai hasonlóságuk miatt egymástól alig megkülönböztethető *Phoma*-szerű fajok taxonómiája terén meglehetősen nagy a bizonytalanság. Vizsgálatunk során a következő szóján előforduló fajokat vizsgáltuk morfológiai tulajdonságok és molekuláris módszerek segítségével.

### ***Phoma pinodella***

A gombát először L.K.Jones írta le 1927-ben *Ascochyta pinodella* néven. A faj taxonómiai korrekciójára Morgan Jones és Burch (1987) vállalkoztak. Szinonimjai között található a ma is előforduló *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L.K. Jones) Boerema (Boerema és mtsai, 1965) név. A feltehetően kozmopolita faj a *Pisum sativum*, *Trifolium pratense* és más pillangós virágúakon károsít, a vöröshere szárfeketedésének, valamint borsó szártőrothadás és levélfoltosság betegségének az előidézője. Gyakran izolálható más családokba tartozó növényekről is (Noordeloos és mtsai, 1993).

Noll (1939) Németországban a Fabaceae fajok szártőrothadás és hervadás betegségét vizsgálva három *Ascochyta pinodella* (= *Phoma pinodella*) izolátumot nyert borsó, lóbab és szója növényekről, melyek mindhárom növényre egyaránt patogének voltak.

A *Phoma pinodella* szóján való hazai károsításáról egy magkórtani vizsgálat alkalmával regisztrált kismérvű előfordulásától eltekintve (Simay, 1992) nincsenek megbízható adatok.

### ***Phoma sojicola***

A szóján előforduló, általában vetőmaggal terjedő, levél- és hüvelyfoltosságot, valamint szártőrothadást és hervadás betegségét vizsgálva Kövics és mtsai (1999) írta le a fajt először a Mycological Research-ben. Patogenitási tesztekben, a szóján előforduló különböző *Phoma* (*P. exigua* var. *exigua*, *P. pinodella*, *Phyllosticta sojicola*) fajok által okozott tünetek nagyban hasonlók a *Phoma sojicola* szóján előidézett tüneteihez (Kövics és mtsai, 1999). A morfológiai jegyei alapján a fajt a *Phoma* genuson belül a *Phoma* section *Phyllostictoides* csoportba lehet elhelyezni. A faj morfológiai tulajdonságai alapján erősen hasonlít a *Phoma pinodella* fajhoz, bár az utóbbi több piknidiumot képez, illetve egyes izolátumoknál kristályképződés is megfigyelhető (Noordeloos és mtsai, 1993). Azonban a *Phoma pinodella* szóján való előfordulásáról a szakirodalom csak kevés adattal rendelkezik. Noll (1939) 3 olyan *Phoma pinodella* fajt izolált, borsóról, disznóbabról (*Faba vulgaris*) és szójáról, amelyek a szójára patogénnek bizonyultak. A *Phoma sojicola* fajt a *Phoma exigua* var. *exigua* fajtól a következők alapján lehet elkülöníteni: a *Phoma sojicola* klamidospórákat képez, a telep növekedése szabályos, illetve a NaOH teszt negatív. A Kövics és mtsai (1995) által végzett  $\alpha$ -észteráz izoenzim vizsgálatok szintén alátámasztják a *Phoma sojicola*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *Phoma pinodella* morfológiai alapon meglévő elkülönülését.

### ***Phyllosticta sojicola* Massalongo teleomorf: *Pleosphaerulina* (= *Pringsheima*, fide von Arx & Mueller) *sojicola* Miura**

A fillosztiktás rák és levéltőfoltosság első leírója *Phyllosticta sojaecola*-ként Massalongo (1900) volt. A *Phyllosticta glycinea* (mint a „*P. glycineum*”) Tehon-Daniels (1927) gomba a *P. sojicola* szinonimjának tekinthető (Farr és mtsai, 1989; Sinclair és Backman, 1989). Hara (1930) a *Phyllosticta sojicola* („*sojaecola*”) Massal.-teleomorfjának tekinti a *Pleosphaerulina*

*sojicola* („*sojaecola*”) (Massal.) Miura (1921)-t. Kurata (1960) vizsgálatai szerint azonban nem volt egészen nyilvánvaló, hogy ez a gomba a *Pleosphaerulina sojicola* anamorfja. A *Pleosphaerulina sojicola* első auktora, valamint helyes névhasználata sem teljesen tisztázott, ugyanis Hara (1930) a „*Pleosphaerulina sojaecola*” (Massal.) „Miura” formát, Kurata (1960) pedig a „*Pleosphaerulina sojaecola* „Miura”-t használja. Minthogy az eredeti leírás számunkra nem volt hozzáférhető, ezért jelen munkánkban a szerzői prioritás kérdése nem válaszolható meg. A szakirodalom az auktor névhasználat tekintetében is megosztott: az előbbi formát használják pl. Sinclair és Shurtleff (1975); Sinclair és Backman (1989), az utóbbit Farr és mtsai (1989). A van der Aa (1973) szerinti *Phyllosticta* genus koncepcióban a *Phyllosticta* anamorf genus tagjai (amennyiben van teleomorfjuk) a *Guignardia* Viala & Ravaz (1982), tömlősgomba genusba tartoznak, amennyiben az életciklusuk spermáciumos (mikrokonídiumos) formát is magába foglal, úgy azok a *Leptodothiorella* Höhnelt *sensu* Sydow ex van der Aa nemzetség tagjai. Von Arx és Müller (1975) a kettősfalú (bitunicatus) Ascomycetes revízióját szolgáló monográfiájukban a *Pleosphaerulina* Pass. (1981) genus névvel szemben a *Pringsheimia* Schulzer (1866) prioritását ismerik el (a *Phyllosticta sojicola* faj revíziójára azonban még nem került sor). A gomba teleomorf alakjának névhasználata tekintetében még a *Pleosphaerulina* tekinthető széleskörben alkalmazottnak. Kövis és mtsai (1999) szerint a szója levelén előforduló és azt megbetegítő *Phyllosticta sojicola* (Massalongo, 1900) morfológiai, patogenitási, illetve izoenzim vizsgálatok alapján megegyezik a *Phoma* genuson belül található több növényen is elforduló *Phoma exigua* var. *exigua*.

***Phoma exigua* Desm. var. *exigua* (syn.: *Ascochyta phaseolorum* Saccardo)**

Az *Ascochyta phaseolorum* Saccardo (= *Phoma exigua* var. *exigua*) előfordulását a szóján Tanganyikában (Wallace és Wallace, 1947, 1949; Riley, 1960), Japánban (Sawada, 1958), Taiwan-on (Sawada, 1959) és Zambiában (Javid és Ashraf, 1978) észlelték. Az *Ascochyta phaseolorum*-ot a *Phaseolus lunatus* L.-on az USA-ba először 1929-ben Sprague találta meg. Később Crossan (1953, 1958) kimutatta, hogy azok az izolátumok, melyek a babról származtak morfológiailag, fiziológiailag és patológiailag hasonlóak azokhoz az izolátumokhoz, melyeket egyéb növényekről, pl. szójáról (*Glycine max*), tehénborsóról (*Gossypium hirsutum*), mályvarózsáról (*Malva* sp.), dohányról (*Nicotina tabacum*), paradicsomról (*Lycopersicum esculentum*) és padlizsánról (*Solanum melongena*) izoláltak. Alcorn (1968) Ausztráliából beszámolt arról, hogy az *Ascochyta phaseolorum* széles gazdanövény-körben károsít: 14 család 48 növényfaján; továbbá 12 fa mesterséges inokuláció során bizonyult fogékonynak. A *Phoma exigua* var. *exigua* olyan gyűjtőtaxon, amely háromezernél jóval meghaladó növénykórokozó fajt foglal magában és korábban önállóként írtak le (Boerema és Höweler, 1967, Boerema 1972, Boerema és Dorenbosch, 1973, Boerema és mtsai, 1993).

Molekuláris taxonómiai vizsgálatainkba az ITS régió mellett a transzlációs elongációs faktort kódoló gén (*tef1*) nagy intronját, illetve a tubulin fehérjét kódoló gén ( *$\beta$ -tubulin*) egy szakaszát vontuk be, amelyeket más élőlény csoportok mellett a gombáknál is eredményesen használtak több esetben.

Az utóbbi években a mikológusok egyre szélesebb körben alkalmazzák az rDNS szekvenciákban talált variabilitást a taxonok közötti rokonsági viszonyok elemzésére. Népszerűségüknek egyik fő oka, hogy a szekvenálendő régió céltudatos megválasztásával megfelelő variabilitás kapható a taxonok közötti rokonsági viszonyok feltárásához: osztály, család, nemzetség, faj, sőt faj alatti szinteken is (Hillis és Dixon, 1991; Lutzoni és Vilgalys, 1995; Binder és Hibbett, 2002). Az ITS szekvenciákat használták fel a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének)

vizsgálatára (Mendes-Pereira és mtsai, 2003), illetve a *Phoma tracheiphila* izolátumok elkülönítésére (Balmas és mtsai, 2005).

A transzlációs elongációs alpha fehérjét kódoló *tefl* gén minden élő szervezetben megtalálható, és az ITS szekvenciákkal szemben nagy előnye, hogy a gén csak egy kópiában van jelen a genomban (Baldauf és Doolittle, 1997). A fajok közötti és fajon belüli rendszertani kapcsolatok felderítésére egyaránt alkalmas, mint azt Druzhinina és Kubicek (2005) is bizonyították *Trichoderma* fajoknál, illetve Roger és mtsai (1999) egyéb fajoknál (pl. *Mucor racemosus*, *Podospora anserina*). Egyetlen hátránya, hogy a fehérjét kódoló *tefl* gén rövidebb, mint más filogenetikai markerként használt gének. Mintegy 2 kb hosszúságú, intront és exont egyaránt tartalmazó szakasz. Filogenetikai vizsgálatunkhoz a *tefl* gén nagy intronját tartalmazó fragmentjét választottuk.

A tubulin fehérje létfontosságú szerepet játszik az eukarióta sejt felépítésében és működésében, hiszen a mikrotubulusok (melyek a citoskeletális rendszer alkotórészei) jórészt tubulin molekulákból épülnek fel. Mivel minden eukarióta sejt tartalmaz mikrotubulusokat, így tubulin molekulákat is, ezért feltételezhető, hogy a tubulin eredete egyidejű az eukarióta szervezetek megjelenésével, mintegy 1,6 milliárd évvel ezelőtt. (Wang és mtsai, 1999). A tubulint felépítő fehérjéket kódoló gének, különösképpen a  $\beta$ -tubulin-t kódoló gén, egyre nagyobb figyelmet kap különböző taxonok közötti (evolúciósan egymáshoz távol és egymáshoz közel lévő taxonok esetében egyaránt) az evolúciós rokonsági kapcsolatok elemzésében során (Keeling és Doolittle, 1996; Baldauf és mtsai, 2000). A gént alkalmazták már filogenetikai vizsgálatokra egysejtűeknél, állatoknál, növényeknél és gombáknál egyaránt (Mages és mtsai, 1995; Keeling és mtsai, 1998; Schutze és mtsai, 1999; Ayliffe és mtsai, 2001, Edgcomb és mtsai, 2001; Hansen és mtsai, 2004). Voigt és mtsai (2005) egyéb gének mellett a  $\beta$ -tubulin gént alkalmazták a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára is, az ITS szekvenciák mellett.

A szekvenciák filogenetikai elemzéseit Bayesian módszerrel végeztük. A Bayesian megközelítés a filogenetikában egy viszonylag új módszer, melyet még csak most kezd széles körben elterjedni. A módszer az úgynevezett utólagos megközelítésen, utólagos valószínűségen (posterior probability) alapuló statisztikai módszer: egy esemény becsült valószínűséget azután adja meg, miután elvégezte a rendelkezésre álló adatok bizonyos elemzését. Mivel az utólagos valószínűséget lehetetlen kiszámolni analitikusan, ezért a módszer egy szimulációs technikát alkalmaz az utólagos valószínűség becslésére. Az analízis a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmuson alapszik, mely egy randomizációs technika az eloszlás valószínűségének megbecsülésére arra az esetre, amikor kivitelezhetetlen, vagy csak nagyon nehezen kivitelezhető lenne az eloszlás meghatározás analitikusan. A Bayesian módszer a statisztika egyik fő ágát képviseli. A legnépszerűbb kereső oldal, a Google is ezt a módszert használja a keresésre. Gyakran hangzik el a válasz a módszert kritizálók felé, ha nem bíznak a Bayesian módszerben a Google keresőt sem kellene használniuk. A módszer nagy előnyét, aminek a Google is köszönheti a mai napig tartó töretlen sikertörténetét, a módszer megbízhatósága és gyorsasága jelenti.

A filogenetikában használt Bayesian algoritmus (Rannala és Yang, 1996; Mau és Newton, 1997; Mau és mtsai, 1999) hasonlít a Maximum Likelihood módszerhez abban a tekintetben, hogy a felhasználónak itt is lehetősége adódik megválasztani a használni kívánt evolúciós modellt, valamint abban, hogy ez a módszer is azokat a törzsfákat keresi, amelyek a leginkább megfelelnek a választott evolúciós modellnek, illetve a kiindulási adathalmaznak (szekvencia összerendezés). Azonban, amíg a ML analízis egy törzsfát keres, a legvalószínűbbet, addig a Bayesian módszer a legvalószínűbb törzsfák egy halmazát keresi. Az ML azt a törzsfát keresi, amely maximalizálja a megfigyelt adatok valószínűséget, amelyek a törzsfát adták. A Bayesian módszer pedig azokat a törzsfákat keresi, amelyek maximalizálják azon törzsfák

valószínűségét, amelyek az adatokat és az evolúciós modellt adták. Az optimális hipotézis az lesz, amely maximalizálja az utólagos valószínűséget. Egy hipotézis utólagos valószínűsége arányos a likelihood értéknek a hipotézis előzetes valószínűségével kapott szorzatával. A különböző hipotézisek előzetes valószínűsége a kutató meggyőződését tükrözi a hipotézisről mielőtt még látta volna az adatokat.

A Bayesian módszer nem csak sokkal gyorsabb mint az ML analízis de pontosabb is bizonyos szempontból, mivel lehetővé teszi a szekvenciaevolúció komplexebb modelljeinek az alkalmazását is. A módszer olyan modellek alkalmazását is lehetővé teszi, amelyek ML analízissel egyáltalán nem vagy csak nagyon nehezen kivitelezhetők. A módszer másik nagy előnye közt említhető, hogy az elemzés során nem csak egy törzsfát kapunk, hanem az egyes elágazások megbízhatóságára is kapunk egyfajta becslést, így már nem szükséges külön bootstrap elemzést végezni. A módszer talán egyetlen hátrányaként említhető, ami akár előnye is lehet, hogy a felhasználó maga dönti el, milyen hosszan akarja futtatni a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmust. Nyilvánvalóan célszerű egy közepes időintervallumot megadni, amikor is az eredmény már elég megbízható, ugyanakkor a számítás belátható időn belül befejeződik. Nincs pontos recept a helyes időtartam megválasztására, mivel az mintánként változik. Nem célszerű túl hosszú elemzést választani, mivel egy pont után a számítás megbízhatósága nem változik jelentősen.

Az elemzés során a végső eredmény nem függ egy vagy több speciális értéktől, mivel a módszer az összes lehetséges paramétert figyelembe veszi a számítás során. Amíg az ML által használt „hill-climbing” algoritmus a paraméterek számának a növekedésével egyre inkább megbízhatatlan, hiszen minden esetben a paraméter maximális értékét keresi addig az MCMC algoritmus nem próbálja megtalálni minden egyes paraméternek a maximális értékét, azonban az összes paramétert figyelembe veszi. Az MCMC algoritmus a valószínűségek eloszlását közelíti meg.

A Bayesian módszert a gyorsasága, egyszerű kezelhetősége, valamint az ez idáig még megválaszolatlan kérdések tanulmányozásának a lehetősége predesztinálja arra, hogy rövid időn belül a legelterjedtebb filogenetikai módszerré váljon.

## Anyag és módszer

Vizsgálatainkban a Debreceni Egyetem Növényvédelmi Tanszékén található törzsgyűjteményből 9 *Phoma* faj, köztük a szóján előforduló 5 faj 7 izolátumát vizsgáltuk (1. táblázat). Minden egyes fajt morfológiai és élettani jellegzetességeik alapján azonosítottunk a Boerema és mtsai (2004) által közreadott *Phoma* monográfia alapján.

### Morfológiai vizsgálatok

A *Phoma* fajok taxonómiájának elfogadott koncepciója in vivo és in vitro stabil morfológiai és tenyésztési paraméterek standardizált feltételek közötti jellemzésen alapul (van der Aa és mtsai, 1990). Morfológiai vizsgálatainkhoz 5 mm átmérőjű micélium korongokat vágunk ki a telepek aktív növekedésű széleiből és Petri csészékben lévő táptalaj közepére helyeztük. A vizsgált táptalajok a következők voltak: Maláta kivonat agar (malt extract agar, MA), amely 40 g malt extract és 20 g agart tartalmaz egy liter desztillált vízben. Zabliszt agar (Oatmeal agar, OA), amely 20 g zabpehely 0,5 l desztillált vízben való felfőzésével, sajtkenőn való átszűréssel, 1 l-re történő deszt. víz feltöltéssel és 20 g agar hozzáadásával készül. Egy hétig sötétben, 20°C hőmérsékleten történő inkubálás után megmértük a telep átmérőket. Rayner (1970) színskálájának megfelelően a micélium szövedék színét, valamint a tenyészet fonáki részének a színét feljegyeztük. Továbbá egyéb morfológiai jellemzőket is (a telep alakja, szektorképzés, légmicélium jellege) feljegyeztünk. Ezt követően a Petri csészéket a piknídium képződését elősegítő 13 órás NUV (black light fluorescent lamp) megvilágítású,

11 órás sötét periódusú ciklikus inkubálásnak tettük ki. Két hét elteltével a telepek jellemzőit ismét feljegyeztük és három hét után tanulmányoztuk a piknídiumok, konídiumok és egyéb struktúrák (pl. klamidospórák) morfológiáját, továbbá mikroszkópi méréseket végeztünk.

### Molekuláris vizsgálatok

Az izolátumokat 50 ml folyékony maláta tápoldatban tenyésztettük 48 órán keresztül, 100 ml-es Erlenmayer lombikban, sötétben, rázatva (125 rpm). A sejteket dörzsmozsár segítségével, folyékony nitrogén jelenlétében tártuk fel, majd genomi DNS-t izoláltunk E.Z.N.A.<sup>®</sup> Fungal DNA Isolation Kit (Omega Bio-tek Inc., USA) alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint. A ITS fragment felszaporításához az SR6R és LR1 primerpárt (White és mtsai, 1990), míg a *tefl* fragment amplifikálásához az EF1-728F és EF1-986R primerpárt használtuk (Druzhinina és Kubicek, 2005), a  $\beta$ -*tubulin* fragment felszaporításához a Bt2a és Bt2b primerpárt (Glass and Donaldson, 1995) használtuk. A tisztított PCR termékek szekvenálását az MWG Biotech, Germany végezte.

A szekvenciákat a ClustalX (Thompson és mtsai, 1997) program felhasználásával rendeztük össze, majd a GeneDoc (Nicholas és mtsai, 1997) program segítségével manuálisan finomítottuk az illesztést, ahol szükséges volt. Ezt követően a filogenetikai analízishez a MrBayes (Huelsenbeck, 2000) programot alkalmaztuk, Bayesian analízist végezve. Az evolúciós modellek tesztelését a Modeltest v.3.7 (Posada és Grandall, 1998) programmal végeztük Bayesian information criterium (BIC) tesztet alkalmazva. A *tefl* fragment elemzésekor a TrNef+I+G evolúciós modell került kiválasztásra, ahol az egyes bázisok gyakorisága egyenlő, a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,000, A-G=1,5807, A-T=1,000, C-G=1,000, C-T=2,8067, G-T=1,000), gamma eloszlásúak, melynek alakparamétere 2,8788, az állandó bázishelyek aránya 0,3015. Az ITS fragment elemzéséhez a TrNef+I evolúciós modellt választottuk a következő paraméterekkel: az egyes bázisok gyakorisága egyenlő, a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,000, A-G=4,8974, A-T=1,000, C-G=1,000, C-T=0,9815, G-T=1,000), azonos eloszlásúak, állandó bázishelyek aránya 0,8497. A  $\beta$ -*tubulin* fragment elemzéséhez a TrNef+G evolúciós modellt választottuk, ahol az egyes bázisok gyakorisága egyenlő, a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,000, A-G=2,3500, A-T=1,000, C-G=1,000, C-T=7,9886, G-T=1,000), gamma eloszlásúak, melynek alakparamétere 0,4090, az állandó bázishelyek aránya 0.

A törzsfák készítésében külső csoportként további taxonok *tefl*, ITS és tubulin szekvenciáit is bevontuk a törzsfák jobb megalapozásához. A szekvenciákat a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> honlapról töltöttük le. A törzsfák elkészítéséhez a TreeView (Page, 1966) programot használtuk.

A filogenetikai analízisekbe külső szekvenciákat is bevontunk, hogy teljesebbé tegyük a törzsfákat. A szekvenciákat a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> honlapról töltöttük le. Az ITS szekvenciák elérhetőségeit az 1. táblázatban, a *tefl* szekvenciák elérhetőségei a 2. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat: kísérletbe bevont *Phoma* fajok listája

Izolátum száma	Alternatív izolátum szám	Fajnév	Gazdanövény	Izolálás helye	Gyűjtő	GenBank hozzáférési számok		
						Tef <sup>a</sup>	ITS <sup>b</sup>	β-tubulin <sup>c</sup>
D/035	BT-15	<i>Phoma pinodella</i>	<i>Glycine max</i>	Hungary	I. Walcz	EU543973	EU573015	EU541416
D/045	PD 82/550	<i>P. pinodella</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543971	EU573025	EU541417
D/046	PD 77/165 MYA-411	<i>P. pinodella</i>	<i>Pisum sativum</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543972	EU573024	EU541419
D/095	N.A.	<i>P. pinodella</i>	<i>P. sativum</i>	Hungary	L. Gergely	EU543970	EU573027	EU541418
D/159	CBS 318.90 PD 81/729	<i>P. pinodella</i>	<i>P. sativum</i>	Netherlands	M.E. Noordeloos	EU595355	EU573028	EU595352
D/054	MYA-406	<i>P. sojicola</i>	<i>G. max</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543974	EU573023	EU541434
D/056	CBS 567.97 PD97/2160	<i>P. sojicola</i>	<i>G. max</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543976	EU573026	EU541433
D/050	CBS 301.39	<i>Phyllosticta sojicola</i>	<i>G. max</i>	Germany	K. Böning	EU595356	EU573029	EU595357
D/075	N.A.	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>G. max</i>	Poland	G.J. Kövics	EU543982	EU555533	EU541421
D/077	N.A.	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>G. max</i>	Poland	G.J. Kövics	EU543983	EU573010	EU541422
D/063	Ph 58 MYA-408	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	Poland	J. Marcinkowska	EU543975	EU573012	EU541420
D/145	N.A.	<i>P. exigua</i>	<i>Althaea officinalis</i>	Hungary	G. Nagy	-	EU573011	EU541425
D/146	N.A.	<i>P. exigua</i>	<i>Althaea rosae</i>	Hungary	G. Nagy	EU543984	EU573013	EU541427
D/158	ICMP 15330	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>Agapanthus</i> sp.	New Zealand	M. Braithwaite	EU543981	EU573008	EU541428
D/157	ICMP 13336	<i>P.<sup>1</sup> exigua</i>	<i>Cucurbita maxima</i>	New Zealand	P.G. Broadhurst	EU543980	EU573007	EU541429
D/071	PD 86/73	<i>P. exigua</i> var. <i>linicola</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543979	EU573009	EU541423
D/072	PD 75/907	<i>P. plurivora</i>	<i>Medicago sativa</i>	Australia	J. de Gruyter	EU552929	EU573018	EU552932
D/155	ICMP 6875	<i>P. plurivora</i>	<i>Pennisetum clandestinum</i>	New Zealand	P.R. Johnston	EU552930	EU573019	EU552931
D/034	AI-416	<i>P. glomerata</i>	<i>G. max</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543969	EU573016	EU541424
D/156	ICMP 15788	<i>P. glomerata</i>	<i>Yucca</i> sp.	New Zealand	C.F. Hill	EU543968	EU573017	EU541426

<sup>1</sup> Az 1. táblázat folytatása a következő oldalon.

D/058	CBS 375.91 PD78/745	<i>P. eupyrena</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Netherlands	G. H. Boerema	EU54 3977	EU573 014	EU541415
D/048	PD 76/1021	<i>P. foveata</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	Netherlands	G. H. Boerema	EU54 3985	EU573 021	EU541431
D/044	PD 77/508	<i>P. multirostrata</i>	<i>Phylodendron</i> sp.	Netherlands	G. H. Boerema	EU54 3986	EU573 022	EU541430
D/144	N.A.	<i>Ascochyta rabiei</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Australia	N.A.	EU59 5354	EU595 358	EU595353
D/160	CBS 581.83A	<i>Didymella rabiei</i>	<i>C. arietinum</i>	Syria	H.A. van der Aa	EU54 3978	EU573 020	EU541432

**AI** Agrobotanikai Intézet, Tápiószele

**BT** Pannon Egyetem, Takarmánytermesztési Kutató Intézet, Iregszemcse-Bicsérd

**CBS** Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollandia;

**D** Debreceni Egyetem, Agár-és Műszaki Tudományok Centruma, Növényvédelmi Tanszék

**ICMP** International Collection of Microorganisms from Plants, Új-Zéland

**MYA** American Type Culture Collection, USA.

**N.A.** = Nincs adat

**PD** Plantenziektenkundige Dienst; Dutch Holland Növényvédelmi Szolgálat, Hollandia

**GenBank** hozzáférési számok: –transzlációs elongációs faktort kódoló gén (*tef1*), részleges szekvencia  
–18S riboszómális RNS gén, részleges szekvencia; internal transcribed spacer 1, 5.8S riboszómális RNS, internal transcribed spacer 2, teljes szekvencia, valamint 26S riboszómális RNS gén részleges szekvencia  
– $\beta$ -tubulin kódoló gén, részleges szekvencia



2. táblázat: Az ITS fragmentek alapján készült filogenetikai törzsfakészítésbe bevont fajok listája, valamint az ITS szekvenciájuknak hozzáférési száma

Fajnév (1)	Izolátum kód (2)	Hozzáférési szám (3)
<i>Phoma pinodella</i>	VPRI 32177	DQ087402.1
<i>Phoma pinodella</i>	VPRI 32171	DQ087400.1
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831556.1
<i>Phoma pinodella</i>	CBS 318.90	AY831562.1
<i>Phoma glomerata</i>	?	AF126816.1
<i>Phoma exigua</i>	?	AY927784.1
<i>Phoma exigua</i> var. <i>populi</i>	CBS 100167	AF268189.1
<i>Phoma exigua</i>	CSL 20316964	AY550992.1
<i>Phoma exigua</i> var. <i>heteromorpha</i>	?	AY899262.1
<i>Phoma herbarum</i>	ATCC 12569	AY293803.1
<i>Phoma herbarum</i>	?	DQ132841.1
<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	WAC 6693	AY831558.1
<i>Ascochyta</i> sp.	Georgia6	DQ383955.1
<i>Ascochyta pisi</i>	AP1	DQ383954.1
<i>Ascochyta lentis</i>	MU AL1	AY131201.1
<i>Didymella lentis</i>	AL1	DQ383953.1
<i>Didymella fabae</i>	AF1	DQ383952.1

3. táblázat: *tef1* fragmentek alapján készült filogenetikai törzsfakészítésbe külső csoportként bevont fajok listája, valamint a *tef1* szekvenciájuknak hozzáférési száma

Fajnév (1)	Izolátum kód (2)	Hozzáférési szám (3)
<i>Ascochyta pisi</i>	AP2	DQ386494.1
teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i> (Kaiser és mtsai, 1997)	SAT AL	AY831546.1
<i>Ascochyta fabae</i> f. sp. <i>viciae</i> (= <i>Ascochyta fabae</i> )	AV11	DQ386498.1
teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i>	AL1	DQ386493.1
teleomorf: <i>Didymella fabae</i> anamorf: <i>Ascochyta fabae</i> (Kaiser és mtsai, 1997)	AF1	DQ386492.1
<i>Phoma pinodella</i>	CBS 318.90	AY831542.1
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831545.1

## Eredmények

### Morfológiai vizsgálatok

A szóján előforduló *Phoma* fajok közül a következő fajokat és izolátumokat vizsgáltuk: *Phoma pinodella* (D/035), *Phoma sojicola* (D/047, D/054), *Phyllosticta sojicola* (D/050), *Phoma exigua* var. *exigua* (D/059, D/075, D/077). Az elvégzett morfológiai vizsgálatok alapján a *Phoma sojicola* és *Phoma pinodella* viszonylag jól elkülönül a *Phoma exigua* var. *exigua* és *Phyllosticta sojicola* fajtól azonban a *Phoma sojicola* és *Phoma pinodella*, valamint a *Phyllosticta sojicola* és *Phoma exigua* var. *exigua* között csekély morfológia különbség mutatkozik.

#### *Phoma pinodella*

Zabliszt agaron (OA): a növekedési ráta: 50-65 mm; a telep szabályos, egyenletes körvonallal rendelkezik; zöldes olíva, sárgás olíva vagy olíva színű, a szegéllyénél halványabb; sugárirányban határozottan sugaras; kevés légmicéliummal rendelkezik; a telep fonáka rendszerint sötétebb olíva szürke. Maláta agaron (MA): a növekedési ráta: 52-55 mm; a telep közepén olíva vagy olíva szürke, a szegély halványabb; a sugárirányú fonalasság erősen kifejezett; a légmicélium vékony, szürkés, bársonyos; a telepfonák olíva szürke vagy fekete. Klamidospórák bőségesen képződnek, interkalárisak vagy terminálisak, magányosan, vagy láncokban keletkeznek, gömbölydedek vagy hengeres alakúak, méretük: 8-20 x 8-15 µm. Piknídiumok is bőségesen keletkeznek általában koncentrikus gyűrűkben, de a légmicéliumban és az agarban is szórtan elhelyezkedhetnek; fekete színűek, csupaszok, magányosan vagy csoportban fordulnak elő; gömbölyűek vagy szabálytalanok; ostiolummal rendelkeznek; 100-310 µm nagyságúak; a piknídiumok fala 4-6 rétegű pseudoparenchymatikus, szögletes sejtekből tevődik össze. A bőségen keletkező konídiumok egysejtűek, ritkán egy válaszfalúak, hyalinok vagy fehéres színűek, kerekded-ellipszoid alakúak; méretük nagyon variábilis: átlagosan 2,5-3 x 5-6 µm.

#### *Phoma sojicola*

Zabliszt agaron (OA): a növekedési ráta: 50-65 mm; a telep szabályos, fehéres vagy halvány olíva szürke, gyakran erős szürke olíva szegéllyel; a légmicélium gyengén fejlett, bársonyos szürke; telepfonák hasonló. Maláta agaron (MA): a növekedési ráta: 55-62 mm; a telep szabályos, szürkés olíva, zöldes olíva színű; a légmicélium halvány olíva szürke; a telep fonáka olomszürke, acélszürke, zöldes olíva szegéllyel. A klamidospórák magányosan vagy láncokban keletkeznek, interkalárisak vagy terminálisak, vékony falúak, zöldes vagy szürke olíva színűek; gömbölydedek vagy hengerek; nagyságuk 7-8 x 8-16 µm. A piknídiumok elsősorban a telep széle mentén keletkeznek az agar felszínén vagy az agarba süppedve; sötétbarna vagy fekete színűek; vékonyfalúak; magányosak vagy komplexek; gömbölyű vagy szabálytalan alakúak. egy vagy több ostiolummal rendelkeznek; nagyságuk 80-250 µm. A konídiumok *in vitro* tenyésztésben: elsősorban egysejtűek ritkán egy válaszfallal rendelkeznek, hyalinok, vékony sejtfallal rendelkeznek, méretük nagyon változó: 2,5-3,5 x 5,6-7,4 µm.

#### *Phyllosticta sojicola*

Zabliszt agaron (OA): a növekedési ráta: 63-67 mm; a telep szabályos, széle alig látható, hyalin vagy halvány okkersárga színű, fonáka hasonló; légmicéliuma nincs. Maláta agaron (MA): a növekedési ráta: 58-62 mm; a telep szabálytalan alakú; barnássárga vagy okkersárga színű, hyalin vagy fehér szegéllyel, a fonák hasonló; légmicélium hyalin vagy fehéres színű;

Piknídiumok az agarban elszórtan bőségesen keletkeznek; gömbölyűek és általában sörétbarna vagy fekete színűek; vékonyfalúak, néha papilláltak, ostiolummal rendelkeznek; méretük átlagosan: 110-140 µm. A konídiumok hyalinok, mindkét végükön lekerekítettek,

középen befűződők, gyakran szemcsék figyelhetők meg bennük; méretük átlagosan: 5,5 x 2,5 µm. Klamidospórák nem képződnek. A NaOH próba negatív és kristályképződés sem figyelhető meg.

### ***Phoma exigua* var. *exigua***

Zabliszt agaron (OA): a növekedési ráta: 55-75 mm, nagyon variábilis; a telep szabálytalan alakú, lapos és tömött; olíva szürke, olíva barna, a szegélynél fehér színű vagy hyalin; a telepek közepén található a bőségesen képződő légmicélium, ami fehér vagy olíva szürke színű, finomon pelyhes; a telep fonák része hasonló. Maláta agaron (MA): a növekedési ráta: 25-60 mm, nagyon változó; a telep szabálytalan alakú, jellegzetesen csipkézett vagy lebenyes; fehéréstől olíva szürkéig - olíva barnáig, barnás sárga szegéllyel; a légmicélium fehéres, olíva szürke, gyapjas; a telep fonák része olíva szürke, olíva fekete. A piknidiumok ritkák, szórt elhelyezkedésűek, részben az agarba süppedtek; olíva vagy olíva fekete színűek, általában gömbölyűek, csupaszok; magányosak vagy komplexek; ostiolummal rendelkeznek; nagyságuk és alakjuk változatos. A konídiumok hyalinok; ovális ellipszoid alakúak; méretük nagyon változó, általában 2,5-3 x 5-6,5 µm átmérőjűek. Mivel a *Phoma exigua* var. *exigua* fajnál a növényen (*in vivo*) az egysejtű konídiumok mellett kétsejtűek is keletkeznek, ez hozzájárulhat a hagyományosan értelmezett *Ascochyta* és *Phoma* fajok összetévesztéséhez. Klamidospórák nem képződnek; a NaOH próba pozitív: egy csepp NaOH felcseppentése után az agar kékes-zöld elszíneződése fokozatosan barnás vörössé válik. Kristályképződés nem figyelhető meg.

## **Molekuláris vizsgálatok**

### ***tefl* fragment elemzése**

A PCR reakciót követően egy 290 bp nagyságú fragmentum szaporodott fel mindenegyik mintában, amely tartalmazta Az egyes fragmentek méretben azonos nagyságúak voltak.

A *tefl* szekvenciák Blast analízise nagy hasonlóságot mutatott a *Phoma* fajokkal közeli rokonságban álló *Ascochyta* fajok *tefl* szekvenciáival, amelyekből néhányat kiválasztottunk és bevontunk az elemzésbe. Az adatbázisban nem találtunk *Phoma* fajtól származó *tefl* szekvenciát.

A több izolátummal is képviselt fajok mind egy csoportba (cluster) kerültek az elemzés során, ami megerősíti a *tefl* szekvencia alkalmasságát a *Phoma* fajok elkülönítésére. A közeli rokon *Ascochyta* nemzetségbe tartozó fajok jól elkülönültek a vizsgált *Phoma* fajoktól.

A bayesian analízis során kapott magas bayesian utólagos valószínűség értékkel értékek (99-100%) megerősítették, az egyes elágazások helyének a valószínűségét, ezzel alátámasztva a filogenetikai törzsfát.

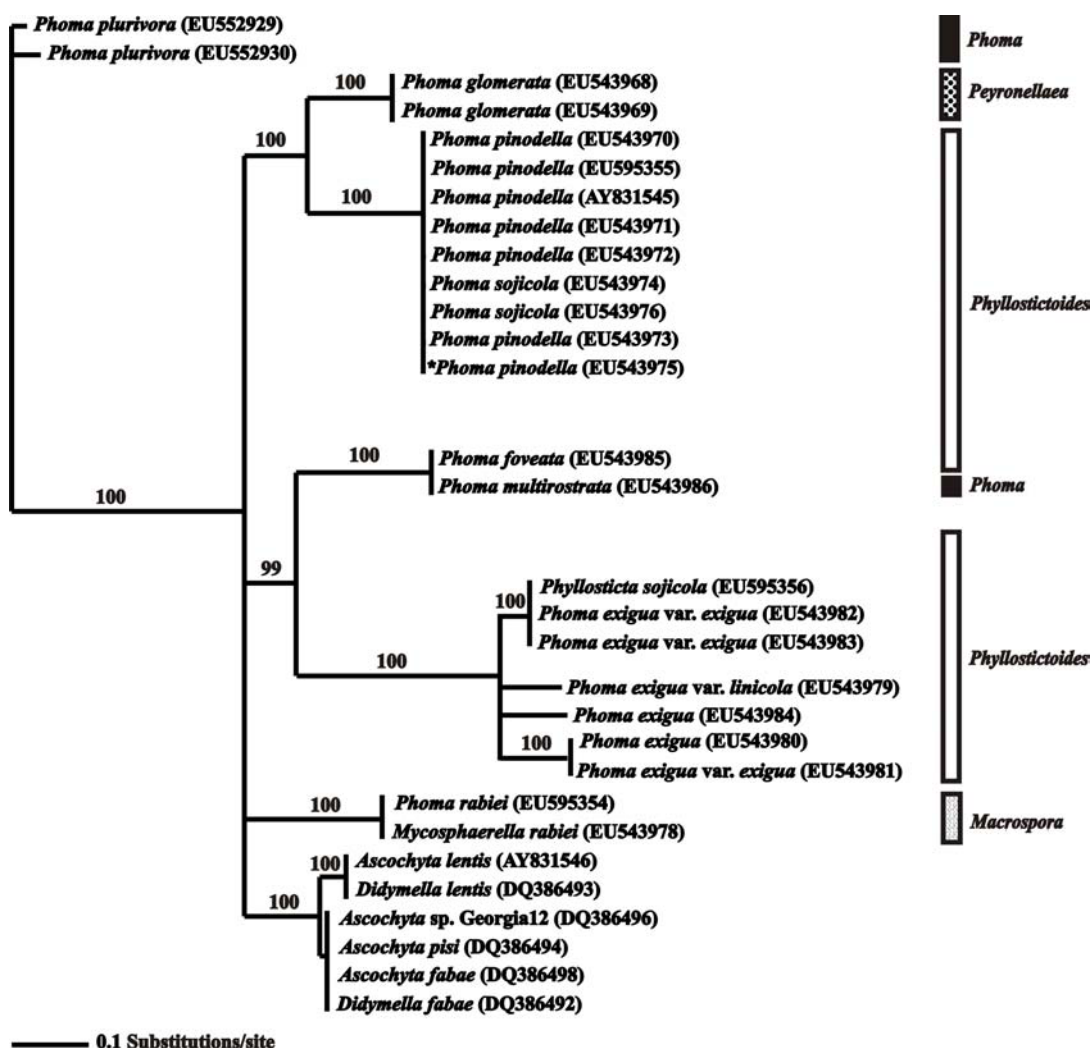
A törzsfán belüli két nagy csoport (*P. exigua* és *P. pinodella*) egyaránt 100 % Bayesian utólagos valószínűség értékkel lett megerősítve, ami azt jelenti, hogy a két csoport a *tefl* szekvencia alapján teljes bizonyossággal elkülönül egymástól és a többi taxontól.

Az egyes taxonok közötti távolságok (elágazások hossza), valamint a további bayesian utólagos valószínűség is elegendőnek bizonyultak az egyes taxonok egymástól való megbízható elkülönítéséhez.

A *P. sojicola* izolátumai (D/054 és D/056) pedig a *P. pinodella* csoportba rendeződtek az elemzés során, mivel az ITS szekvenciájuk gyakorlatilag megegyezik.

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39) a *tefl* régió alapján a *P. exigua* csoportba került.

Az egyes taxonómiai csoportok a Parsimony elemzés alapján sem mutatnak egyezést a morfológia bélyegeken alapuló *Phoma* taxonokkal.



### 1. ábra: A *tefl* szekvenciák bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfa.

A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik. A vonalakra írt számok az egyes elágazások bayesian típusú utólagos valószínűség értékeknek felelnek meg

### *β-tubulin* fragment elemzése

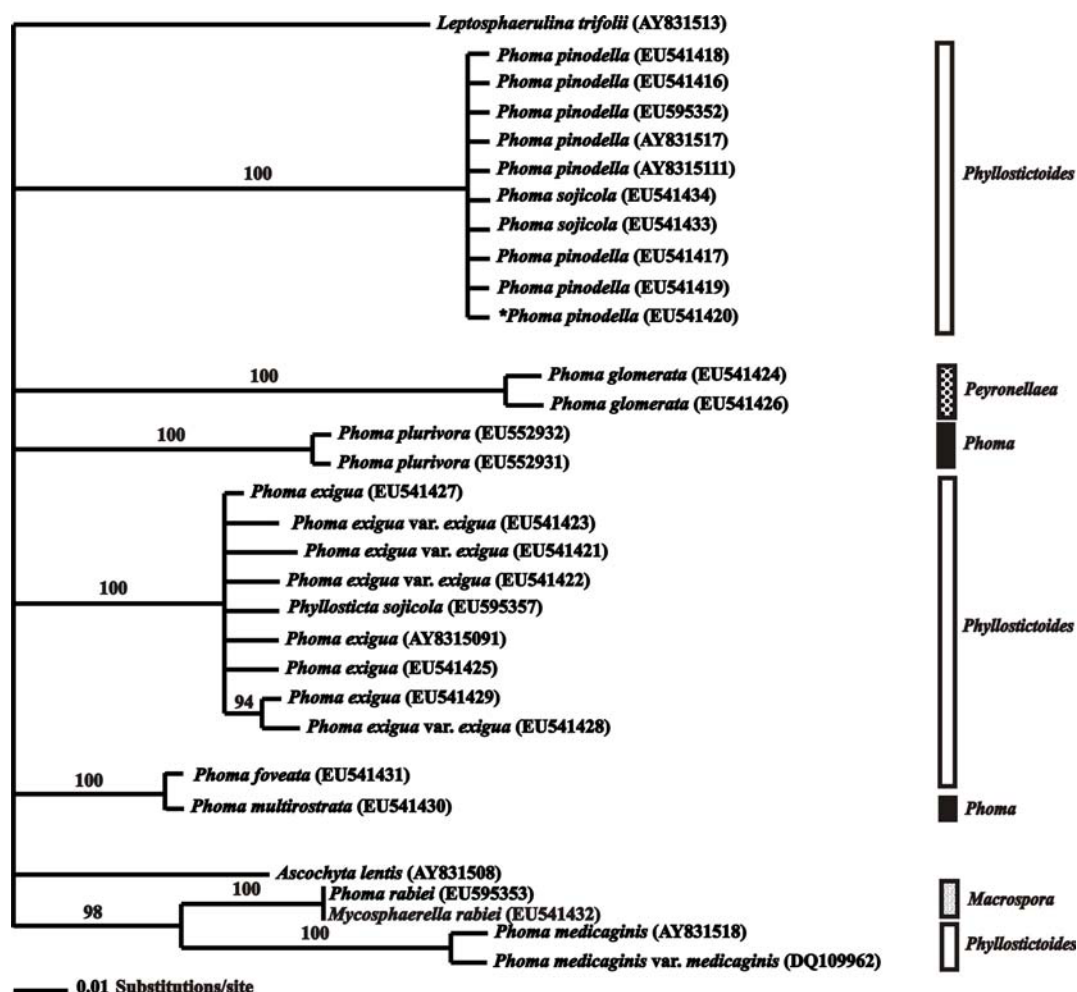
A genomi DNS izolációját követően a PCR reakcióban a felhasznált primerekkel (Bt2a és Bt2b) egy 300 bp nagyságú *β-tubulin* szakasz amplifikálódott mindegyik izolátum esetében. A PCR reakcióban melléktermék nem képződött, amely a primerek nagyfokú specifikusságát bizonyítja.

A *β-tubulin* szekvenciák Blast analízise szintén az *Ascochyta* fajokkal mutatott nagyfokú hasonlóságot, amelyekből néhányat kiválasztottunk és bevontunk az elemzésbe.

A *β-tubulin* szekvencia elemzésével kapott törzsfa alapján (2. ábra) a vizsgált *Phoma* fajok egyértelműen elkülönültek a közel rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól.

A *Phoma pinodella* és a *Phoma exigua* fajhoz tartozó izolátumok egymástól jól elhatárolódó csoportokat alkotnak a *β-tubulin* szekvencia alapján is.

*Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum a *β-tubulin* szekvencia alapján is a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba került. A *Phoma sojicola* pedig az *tefl* szekvenciához hasonlóan itt is a *Phoma pinodella* csoportba rendeződött.



2. ábra: A  $\beta$ -tubulin szekvenciák Bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik. A vonalakra írt számok az egyes elágazások Bayesian típusú utólagos valószínűség értékeknek felelnek meg.

### ITS fragment elemzése

A PCR reakciót követően egy 520 bp nagyságú fragmentum szaporodott fel minden egyes mintában, amely tartalmazta az ITS1, ITS2, valamint az 5,8S régiókat. Az elemzést 454 bp-al végeztük, hogy megkönnyítsük az adatbankból származó szekvenciákkal történő összehasonlítást.

Az ITS régió bayesian módszerrel történő elemzése során kapott filogenetikai törzsfá (3. ábra) lényegiekben egyezik, kisebb eltérésekkel az előző két fragment alapján kapott törzsfával.

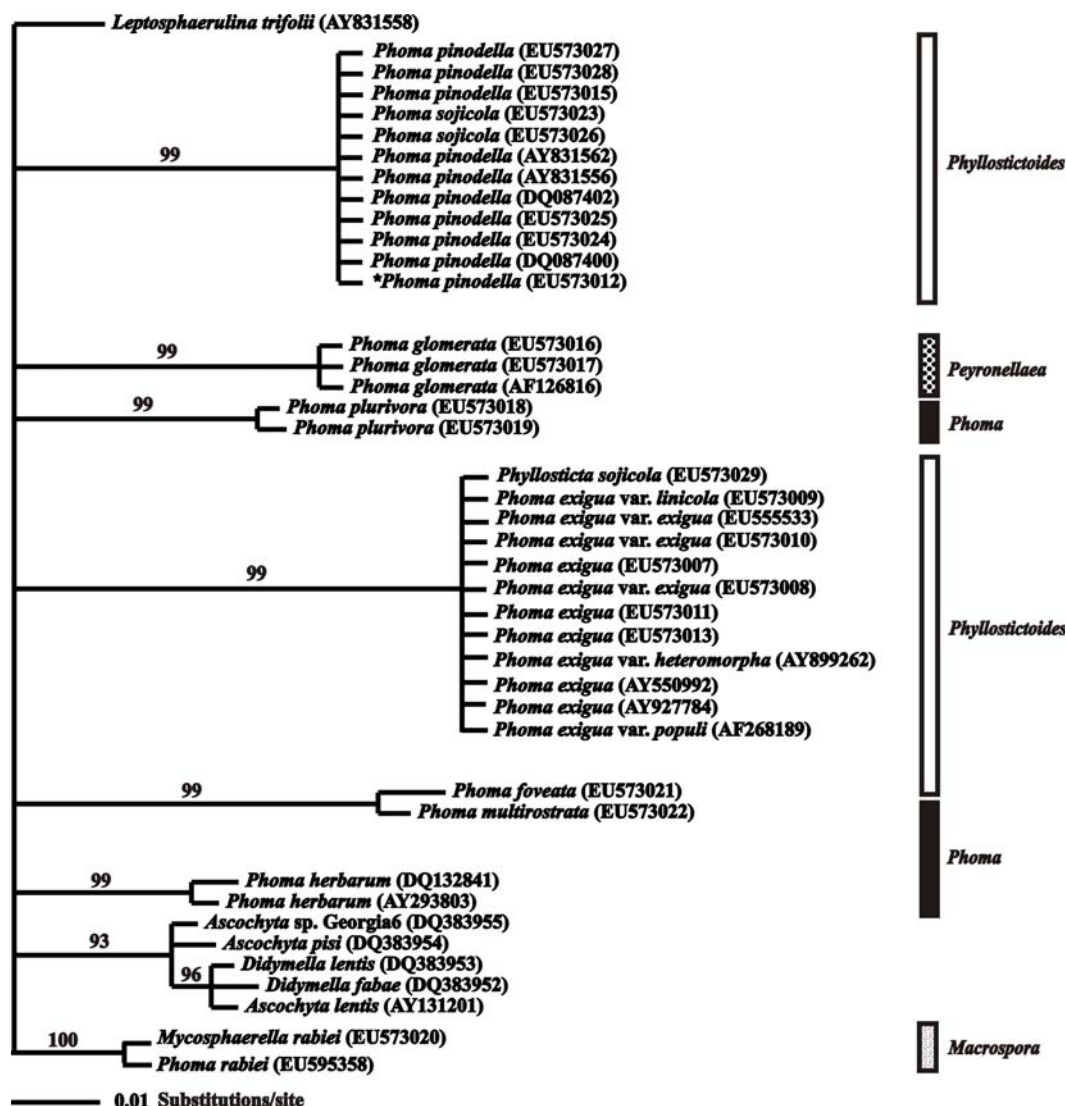
Amit ez előző két törzsfánál elmondtunk az itt is elmondható: a törzsfán belüli két nagy csoport (*P. exigua* és *P. pinodella* izolátumai) 99% Bayesian utólagos valószínűség értékkel lett megerősítve, ami azt jelenti, hogy a két csoport az ITS szekvencia alapján teljes bizonyossággal elkülönül egymástól és a többi *Phoma* taxontól.

Az egyes taxonok közötti távolságok (báziskülönbség), valamint a további Bayesian utólagos valószínűség értékek ez alkalommal nem bizonyultak elég jelentősnek az egyes taxonok egymástól való megbízható, kétségeket kizáró elkülönítéséhez.

A *P. sojicola* izolátumai (D/054 és D/056) pedig a *P. pinodella* cluster-be kerültek a Bayesian elemzés során is.

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39) az ITS régió alapján a *P. exigua* csoportba került.

Az egyes csoportok az ITS régió Bayesian módszerrel történő elemzése során sem mutatnak egyezést a morfológia bélyegeken alapuló *Phoma* taxonokkal.



### 3. ábra: Az ITS szekvenciák Bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá.

A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik. A vonalakra írt számok az egyes elágazások Bayesian típusú utólagos valószínűség értékeknek felelnek meg.

Mivel a *Phoma* és *Ascochyta* fajok elkülönítése morfológiai alapon gyakran nem könnyű feladat az *in vivo* különböző sejtszámú konídiummal rendelkező *Phoma* (pseudo-*Ascochyta*) fajok esetében, ez a molekuláris bélyeg további segítséget nyújthat a hovatartozás egyértelmű megállapításához.

A *Phoma pinodella* és a *Phoma exigua* fajhoz tartozó izolátumok egymástól jól elhatárolódó csoportokat alkotnak a *tefl* szekvencia alapján is.

*Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum a *tefl* szekvencia alapján is a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba került. A *Phoma sojicola* pedig az ITS szekvenciához hasonlóan itt is a *Phoma pinodella* csoportba rendeződött.

## Összefoglalás

Vizsgálatunk során 9 *Phoma* faj 23 izolátumát vizsgáltuk. Először minden egyes fajt morfológiai és élettani jellegzetességeik alapján azonosítottunk, majd elvégeztük a molekuláris vizsgálatokat.

Vizsgálataink során a szóján (*Glycine max*) előforduló *Phoma*-szerű gombák molekuláris taxonómiai vizsgálatát végeztük el genetikai markerek szekvenciáinak elemzésével. A szóján előforduló, szimptomatológiai és morfológiai hasonlóságuk miatt egymástól alig megkülönböztethető *Phoma*-szerű fajok (*Phoma pinodella*, *Phoma sojicola*, *Phyllosticta sojicola*, *Phoma exigua* var. *exigua*) taxonómiája terén a mai napig nagy a bizonytalanság.

A vizsgált izolátumok morfológiai sajátosságai, bizonyos esetekben rendkívüli hasonlósága (a *Phoma pinodella* és *Phoma sojicola* között) megkérdőjelezheti a *Phoma sojicola* faji identitásának fenntartását vagy revíziójának szükségességét.

Molekuláris vizsgálatainkhoz három markert választottunk (*tefl*, ITS, *tubulin*), amelyek szakirodalmi adatok alapján korábban már alkalmasnak bizonyultak filogenetikai kapcsolatok tanulmányozására más élőlénycsoportokban, így a gombák körében is. Filogenetikai vizsgálatok során célszerű több gént vizsgálni, mivel GCPSR elmélet szerint (Taylor és mtsai, 2000) több gén használatakor pontosabb és megbízhatóbb eredményt kapunk az egyes filogenetikai kapcsolatokra.

A DNS szekvencia analízise a *Phoma* fajok esetében eddig csak kisebb csoportok elkülönítő vizsgálatára korlátozódott.

Az ITS szekvenciákat használták fel a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára (Mendes-Pereira és mtsai, 2003), illetve a *Phoma tracheiphila* izolátumok elkülönítésére (Balmas és mtsai, 2005). Voigt és mtsai (2005) egyéb gének, köztük az ITS szekvenciák mellett a  $\beta$ -*tubulin* gént alkalmazták a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára, valamint Fatehi és mtsai (2003) az „Ascochyta pinodes komplex” taxonómai vizsgálatok. Landvik és mtsai (2001) a  $\beta$ -*tubulin* fehérjét alkotó aminosavak szekvenciájának egy részét próbálta használni magasabb rendű taxonok elkülönítésére az Ascomycota csoporton belül. Arra a következtetésre jutottak, hogy a  $\beta$ -*tubulin* gén kevésbé alkalmas magasabb szintű rendszertani kapcsolatok elemzésére, mint más gének. Nukleotid szinten azonban a  $\beta$ -*tubulin* gén informatívnak bizonyult az Ascomycota csoportnál alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok elkülönítésénél (Jong és mtsai, 2001; O'Donnell és mtsai, 1998; Schoch és mtsai, 2001).

A *tefl* és  $\beta$ -*tubulin* szekvenciákat *Phoma* fajok filogenetikai vizsgálatának céljából ez idáig még nem alkalmazták.

Vizsgálatunk során az ITS szekvenciák mellett a *tefl* és a  $\beta$ -*tubulin* szekvenciákat egyaránt alkalmasnak találtuk az egyes *Phoma* izolátumok genetikai elkülönítésére. Mindhárom szekvencia alapján készült filogenetikai törzsfa hasonló filogenetikai kapcsolatokat.

Eredményeink alapján a *tefl* és a  $\beta$ -*tubulin* szekvenciák megbízhatóbbnak bizonyultak mint az ITS, mivel az ITS szekvenciák esetében az egyes taxonok közötti távolságok (báziskülönbség), továbbá a Bayesian utólagos valószínűség értékek nem bizonyultak elég jelentősnek az egyes taxonok egymástól való megbízható, kétségeket kizáró elkülönítéséhez.

A három szekvencia közül különösen a *tefl* szekvencia bizonyult a legalkalmasabbnak a *Phoma* fajok filogenetikai vizsgálatához, így a *tefl* a többi fonalas gombához hasonlóan (Druzhinina és Kubicek, 2005) a *Phoma* fajok körében is alkalmas filogenetikai vizsgálatokra.

Az egy fajhoz tartozó izolátumok (*Phoma exigua* var. *exigua* és *Phoma pinodella*) egymástól jól elkülönült csoportokat alkotnak mindhárom szekvenciák alapján.



Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39) a *tef1*, ITS és tubulin szekvenciák alapján egyaránt a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba került, ami alátámasztja Kövics és mtsai (1999) feltételezését, miszerint a *Phyllosticta sojicola* megegyezik a *Phoma exigua* var. *exigua* fajjal. A *Phoma sojicola* pedig a *Phoma pinodella* csoportba került az elemzés során, mivel *tef1*, ITS és tubulin szekvenciájuk gyakorlatilag teljesen azonos. Ez megerősítheti azt a feltételezést, hogy a *Phoma sojicola* a *Phoma pinodella* egy a szóján előforduló patovarietasa (Kövics, személyes közlés).

Mindhárom szekvencia Bayesian módszerrel végzett filogenetikai elemzése megerősítette, hogy az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba, a *Phoma sojicola* pedig a *Phoma pinodella* csoportba rendeződött, ami szükségessé teheti a nevezett taxonok helyzetének újragondolását.

## Irodalom

- Aa, H.A. van der (1973): Studies in *Phyllosticta* I. Studies in Mycology 5: 1-110.
- Aa, H.A., van der, Noordeloos, M.E., de Gruyter, J. (1990): Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. Studies in Mycology 32: 3-19.
- Alcorn, J.L. (1968): Occurrence and host range of *Ascochyta phaseolorum* in Queensland. Australian Journal of Biological Sciences 21: 1143-1151.
- Arx, J.A. von, Müller, E. (1975): A re-evaluation of the bitunicate *Ascomycetes* with keys to families and genera. Studies in Mycology Baarn 9: 1-159.
- Avise, J.C. (2004): Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Underland, MA: Sinauer Associates
- Ayliffe, M. A., Dodds, P. N., Lawrence, G. J. (2001): Characterisation of a beta-tubulin gene from *Melampsora lini* and comparison of fungal beta-tubulin genes. Mycological Research 105: 818–826.
- Baldauf, S.L. and Doolittle, W.F. (1997): Origin and evolution of slime molds (Mycetozoa): Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94: 12007-12012.
- Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I., Doolittle, W. F. (2000): A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. Science 290: 972–977.
- Balmas, V., Scherm, B., Ghignone, S., Salem, A.O.M., Cacciola, S.O., Migheli, Q. (2005): Characterisation of *Phoma tracheiphila* by RAPD-PCR, microsatellite-primed PCR and ITS rDNA sequencing and development of species primers for in planta PCR detection. European Journal of Plant Pathology 111: 235-247.
- Binder, M., Hibbett, D.S. (2002): Higher-level phylogenetic relationships of *Homobasidiomycetes* (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. Molecular Phylogenetics and Evolution 22 (1): 76-90.
- Boerema, G.H. (1972): *Ascochyta phaseolorum* synonymous with *Phoma exigua*. Short communication. Netherlands Journal of Plant Pathology 78: 113-115.
- Boerema, G.H., Dorenbosch, M.M.J. (1973): The *Phoma* and *Ascochyta* species described by Wollenweber and Hochapfel in their study on fruit-rotting. CBS Studies in Mycology 3: 1-50.
- Boerema, G.H., Höweler, L.H. (1967): *Phoma exigua* Desm. And its varieties. Persoonia 5: 15-28.
- Boerema G.H., van Kesteren H.A. (1981): The nomenclature notes on some species of *Phoma* sect. *Plenodomus*. Persoonia 11: 317-331.
- Boerema G.H., Dorenbosch, M.M.J., van Kesteren, H.A. (1965): Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea*. Persoonia. 4: 47-68.
- Boerema G.H., Dorenbosch, M.M.J., van Kesteren, H.A. (1968): Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea* II. Persoonia. 5: 201-205.



- Boerema G.H., Dorenbosch, M.M.J., van Kesteren, H.A. (1971): Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea* III. *Persoonia*. 6: 171-177.
- Boerema G.H., Dorenbosch, M.M.J., van Kesteren, H.A. (1973): Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea* IV. *Persoonia*. 7: 131-139.
- Boerema G.H., Dorenbosch, M.M.J., van Kesteren, H.A. (1977): Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea*. V. *Kew Bull.* 31: 533-544. „1976”
- Boerema, G.H., Kesteren, H.A., van Loerakker, W.M. (1981): Notes on *Phoma*. *Transactions of the British Mycological Society* 77: 61-74.
- Boerema et al. (1993): Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Re-print of twelve papers (1992-1993) originally published in the *Netherlands Journal of Plant Pathology*, with cumulative index. *Libri Botanici* Vol. 10. IHW-Verlag.
- Boerema, G.H., de Gruyter, J., de, Noordeloos, M.E., Hamers, M.E.C. (2004): *Phoma* identification manual. Differentiation of species and infra-specific taxa in culture. CABI Publishing, CAB International Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Crossan, D.F. (1953): Comparative studies of *Ascochyta* from okra, bean and cotton in North Carolina. Abstracts of papers accepted for presentation are the 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Phytopathological Society Madison, Wisconsin, Sept. 7-10, 1953. *Phytopathology* 43: 469.
- Crossan, D.F. (1958): The relationships of seven species of *Ascochyta* occurring in the North Carolina. *Phytopathology* 48: 248-255.
- Druzhinina, I. and Kubicek, C.P. (2005): Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species cluster? *J. Zhejiang University of Science* 6B (2): 100-112.
- Edgcomb, V. P., Roger, A. J., Simpson, A. G. B., Kysela, D. T., Sogin, M. L. (2001): Evolutionary relationships among “jakobid” flagellates as indicated by alpha- and beta-tubulin phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 18: 514–522.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., Rossman, A.Y. (1989): *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 1-1252.
- Fatehi, J., Bridge, P.D., Punithalingam, E. (2003): Molecular relatedness within the “*Ascochyta pinodes*”-complex. *Mycopathologia* 156: 317-327.
- Hansen, K., LoBuglio, K.F., Pfister, D.H. (2004): Evolutionary relationships of the cup-fungus *Peziza* and *Pezizaceae* inferred from multiple nuclear genes: RPB2,  $\beta$ -tubulin, and LSU rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 1-23.
- Hara, K. (1930): *Pathologia agriculturalis plantarum*, ed. 2. Tokyo. 1-950. (*Mycosphaerella sojae* Hori. *Ascochyta sojae* Miura. 276-277.) (in Japanese).
- Hillis, D.M., Dixon, M.T. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Javid, J., Ashraf, M. (1978): Some observations on soybean diseases in Manchurica. *Manchurica Agr.Expt.Sta.Rpt.* 45: 223.
- Jones, L.K. (1297): Studies of nature and control of blight, leaf and pod spot, and footrot of peas caused by species of *Ascochyta*. *Bulletin of the New York State Agricultural Experiment Station* 547.
- Jong, S.N., Lévesque, C.A., Verkley, G.J.M., Abeln, E.C.A., Rahe, J.E., Braun, P.G. (2001): Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull’s-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the  $\beta$ -tubulin gene. *Mycological Research* 105: 658–669.
- Keeling, P. J., Doolittle, W. F. (1996): Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1297–1305.

- Keeling, P. J., Deane, J. A., McFadden, G. I. (1998): The phylogenetic position of alpha- and beta-tubulins from the *Chlorarachnion* host and *Cercomonas* (Cercozoa): Journal of Eukaryotic Microbiology 45: 561–570.
- Kövics, G.J. (2004): New observations on etiology of pea *Ascochyta-Phoma* disease complex and  $\alpha$ -esterase isozymes of *Phoma pinodella*. (Újabb megfigyelések a borsó ragya betegségkomplex etiológiája és a *Phoma pinodella* faj összehasonlító  $\alpha$ -észteráz izozimjeinek vizsgálataiban.) pp. 127-137. In: Integrated agronomy models in the agriculture of 21st century. Plant production. Pepó, P.-Sárvári, M. (Eds): Debrecen University Press, Debrecen.
- Kövics, G. and Gruyter, J. de (1995): Comparable esterase isozyme analysis of some *Phoma* species occur on soybean. (A szóján előforduló néhány *Phoma* faj észteráz izoenzim mintázatainak összehasonlító vizsgálata.) Proceedings of Debrecen Agricultural University (DATE Tudományos Közleményei) 31: 191-207.
- Kövics, G.J., Gruyter, J. de, and Aa, H.A. van der (1999): *Phoma sojicola* comb. nov. and other hyaline-spored coelomycetes pathogenic on soybean. Mycological Research. 103 (8): 1065-1070.
- Kurata, H. (1960): Studies of the fungal diseases of soybean in Japan. Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences. Tokyo, Ser.C. (in Japanese with English Summary) 1-153.
- Landvik, S., Eriksson, O.E., Berbee, M.L. (2001): *Neolecta*—a fungal dinosaur? Evidence from  $\beta$ -tubulin amino acid sequences. Mycologia 93: 1151–1163.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C.J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T.Y., Baloch, E., Grube, M., Reeb, V., Hofstetter, V., Schoch, C., Arnold, A. E., Miadlikowska, J., Spatafora, J., Johnson, D., Hambleton, S., Crockett, M., Shoemaker, R., Sung, G.H., Lucking, R., Lumbsch, T., O'Donnell, K., Binder, M., Diederich, P., Ertz, D., Gueidan, C., Hansen, K., Harris, R.C., Hosaka, K., Lim, Y.W., Matheny, B., Nishida, H., Pfister, D., Rogers, J., Rossman, A., Schmitt, I., Sipman, H., Stone, J., Sugiyama, J., Yahr, R., Vilgalys, R. (2004): Assembling the fungal tree of life: progress classification and evolution of subcellular traits. American Journal of Botany 91: 1446-1480.
- Lutzoni, F., Vilgalys, R. (1995): Integration of morphological and molecular data sets in estimating fungal phylogenies. Canadian Journal of Botany 73: S649-659.
- Mages, W., Cresnar, B., Harper, J. F., Brüderlein, M., Schmitt, R. (1995): *Volvox carteri* alpha-2-tubulin-encoding and beta-2-tubulin-encoding genes: regulatory signals and transcription. Gene 160: 47–54.
- Massalongo, C. (1900): De Nunnulis Speciebus NOvis. Mycromycetum Agri Veronensis. Attivita Istituto Veneto di Scienze. 59: 684-690.
- Mau, B., Newton, M. (1997): Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlos. Journal of Computer and Graphics Statistical 6: 122-131.
- Mau, B., Newton, M., Larget, B. (1999): Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. Biometrics 55: 1-12.
- Mendes-Pereira, E., Balesdent, M.-H., Brun, H., Rouxel, T. (2003): Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans-L. biglobosa* species complex. Mycol. Res. 107 (11): 1287-1304.
- Miura, M. (1921): Disease of the main agricultural crops of Manchuria. So. Manchuria Railway Co.Agr.Expt.Sta.Bull. 11: 1-56. (in Japanese, English Abstract, Japan Journal Botany. 1: 9. (1922).
- Monte, E., Bridge, P.D., Sutton, B.C. (1990): Physiological and biochemical studies in Coelomycetes. *Phoma*. Studies in Mycology 32: 21-28.
- Monte, E., Bridge, P.D., Sutton, B.C. (1991): An integrated approach to *Phoma* systematics. Mycopathologia 115: 89-103.

- Morgan-Jones, G., Burch, K.B. (1987): Studies on the genus *Phoma*. VIII. Concerning *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*. Mycotaxon 29: 477-487.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr., Deerfield, D.W. II. (1997): GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, Embnew. news 4: 14.
- Noll, W. (1939): Studies on foot rot and wilt in Leguminosae. Z. Pfl.krankheiten 49: 385-431.
- Noordeloos, M.E., de Gruyter, J., van Eijk, G.W., Roeijmans, H.J. (1993): Production of dendritic crystals in pure cultures of *Phoma* and *Ascochyta* and its value as a taxonomic character relative to morphology, pathology, and cultural characteristics. Mycological Research 97: 1343-1350.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I. (1998): Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 465-493.
- Page, R.D.M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.
- Posada, D., Grandall K.A. (1998): Modeltest: Testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14: 817-818.
- Rannala, B., Yang, Z. H. (1996): Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. Journal of Molecular Evolution 43: 304-311.
- Rayner, R.W. (1970): a mycological color chart. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, and British Mycological Society.
- Riley, E.A. (1960): A revised list of plant diseases in Tanganyika Territory. Commonwealth Mycological Institute, Mycological Papers 75: 18.
- Roger, A.J., Sandblom, O., Doolittle, W.F., Philippe, H. (1999): An evaluation of elongation factor 1 $\alpha$  as a phylogenetic marker for eukaryotes. Molecular Biology and Evolution 16: 218-233.
- Saniewska, A, Prus-Glowacki, W. (1998): Mycelial growth, pathogenicity and electrophoretic characteristics of some enzymes among isolates of *Phoma narcissii* (Aderh.) Boerema, de Gruyter et Noordeloos from *Hippeastrum*, *Narcissus* and *Hymanocallis*. Phytopathologica Polonica 1998 (15): 5-13.
- Sawada, K. (1958): Researches on fungi in the Tohoku District of Japan. IV. Fungi Imperfecti. Tokyo Govt.For.Expt.Sta., Meguro, Bull. 105: 35-140.
- Sawada, K. (1959): Descriptive catalogue of Taiwan (Formosan) fungi. Part XI. National Taiwan University (Taipei) Coll.Agr.Spec.Bull. 8: 1-268.
- Schoch, C.L., Crous, P.W., WingWeld, B.D., WingWeld, M.J. (2001): Phylogeny of *Calonectria* based on comparisons of  $\beta$ -tubulin DNA sequences. Mycological Research 105: 1045-1052.
- Schutze, J., Krasko, A., Custodio, M. R., Efremova, S. M., Muller, I. M., Muller, W. E. G. (1999): Evolutionary relationships of Metazoa within the eukaryotes based on molecular data from Porifera. Proceedings of the Royal Society London. B 266: 63-73.
- Simay, E.I. (1992): Magvizsgálatok eredményei. XIX. – Néhány, a szója magpenészesedését okozó gomba. Növényvédelem 28 (4): 168-171.
- Sinclair, J.B., Backman, P.A. (1989): Compendium of soybean diseases. Third edition. APS Press, St. Paul, Minesota, USA. 1-106.
- Sinclair, J.B., Schurtleff, M.C. (1975): Compendium of soybean diseases. First edition. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 1-69.
- Sprague, R. (1929): Host range and life-history studies of some leguminous *Ascochytae*. Phytopathology 19: 917-932.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., and Fisher, M.C. (2000): Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genetics and Biology 31: 21- 32.

- Theon, L.R., Daniels, E.Y. (1927): Notes of parasitic fungi of Illinois III. *Mycologia* 19: 110-129.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Voigt, K., Cozijnsen, A. J., Kroymann, J., Pöggeler, S., Howlett, B.J. (2005): Phylogenetic relationships between members of the crucifer pathogenic *Leptosphaeria maculans* species complex as shown by mating type (MAT1-2), actin and  $\beta$ -tubulin sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 541-557.
- Wang, D. Y.-C., Kumar, S., Hedges, S. B. (1999): Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proceedings of the Royal Society London. B* 266: 163–171.
- Wallace, G.B., Wallace, M.M. (1947): Second supplement to the revised list of plant disease in Tanganyika Territory. Commonwealth Mycological Institute, Mycological Papers 26: 1-26.
- Wallace, G.B., Wallace, M.M. (1949): A list of plant diseases of economic importance in Tanganyika Territory. Commonwealth Mycological Institute, Mycological Papers 26: 4.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: PCR protocols. A guide to methods and applications. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.) Academic Press, New York.

## PHYLOGENETIC STUDIES ON *PHOMA*-LIKE FUNGI OCCURRING ON SOYBEAN BY BAYESIAN APPROACHES

**L. Irinyi – G. J. Kövics – E. Sándor**

University of Debrecen, Centre for Agricultural Sciences and Engineering , Department of Plant Protection,  
Debrecen, Hungary

In this study, we carried out phylogenetic studies analyzing sequences of genetic markers in the taxonomy of *Phoma*-like fungi. The *Phoma*-like species occurring on soybean are hard to identified because of their high morphological and symptomatic similarities.

We employed a part of the gene responsible for the synthesis of translation elongation factor 1 subunit alpha protein (*tef1*) containing both introns and exons, ITS region containing the internal transcribed spacer regions 1 and 2 and the 5.8S rDNA, as well as  $\beta$ -tubulin partial sequences as potential genetic markers to infer phylogenetic relationships among different *Phoma* taxa. Twenty-three different *Phoma* isolates were firstly characterised by morphologically, and then their ITS and *tef1* sequences were sequenced and analysed by Bayesian approaches.

Bayesian analyses of the three sequences confirmed that the *Phyllosticta sojicola* species is clustered with the *Phoma exigua* var. *exigua* group as Kövics et al. (1999) claimed and the *Phoma sojicola* is grouped with *Phoma pinodella* group. The experienced molecular evidences initiate the demand of reclassification of formerly mentioned soybean pathogens.